

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年12月20日 (20.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/96575 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/54, 9/12, 1/21,
C12Q 1/48, C07K 16/40, A61K 31/7125, 48/00, A61P
3/04, 3/10, 7/00, 25/00, 29/00, 31/18, 35/00

(SUGIURA, Masako) [JP/JP]. 河野圭太 (KONO, Keita) [JP/JP]. 古濱孝文 (KOHAMA, Takafumi) [JP/JP]: 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04889

(74) 代理人: 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.): 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001年6月11日 (11.06.2001)

(81) 指定国(国内): AU, BR, CA, CN, CO, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SK, US, ZA.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

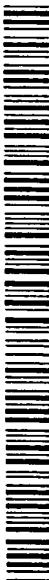
(30) 優先権データ:
特願2000-178039 2000年6月14日 (14.06.2000) JP

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三共株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]: 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 杉浦雅子



(54) Title: CERAMIDE KINASE AND DNA ENCODING THE SAME

A1

(54) 発明の名称: セラミドキナーゼおよびそれをコードするDNA

WO 01/96575

(57) Abstract: A novel protein having a ceramide kinase activity which would be usable as a target of preventives or remedies for nerve diseases, inflammation, HIV, type 2 diabetes, obesity, sepsis, arteriosclerosis and cancer. More particularly, a protein comprising the amino acid sequence represented by amino acid nos. 1 to 537 in SEQ ID NO:2 in Sequence Listing; a DNA encoding this protein; a recombinant DNA vector containing this DNA; a host transformed by this recombinant DNA vector; a process for producing the above ceramide kinase and use of this protein. Use of this process makes it possible to search for novel compounds having an activity of specifically activating or inhibiting ceramide kinase and being useful as remedies for nerve diseases, anti-inflammatory agents, remedies for HIV, anti-type 2 diabetic agents, antidiabetic agents, antiseptic agents, antiarteriosclerotic agents and carcinostatic agents.

〔続葉有〕



(57) 要約:

本発明は、神経性疾患、炎症、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、動脈硬化および癌の予防または治療薬の標的となりうる、セラミドキナーゼ活性を有する新規タンパク質を提供するものである。

具体的には、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含むことからなる組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換せしめた宿主、該セラミドキナーゼの製造方法および該タンパク質の用途を提供する。

本発明の方法を用いて、セラミドキナーゼに対して特異的な活性化または阻害活性を有し、神経性疾患治療薬、抗炎症剤、HIVの治療薬、抗2型糖尿病薬、抗肥満薬、抗敗血症薬、抗動脈硬化薬および制癌剤として有用な新規化合物の探索が可能である。

明細書

セラミドキナーゼおよびそれをコードするDNA

[技術分野]

本発明は、神経性疾患、炎症、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、動脈硬化および癌の予防または治療薬の標的となりうる、セラミドキナーゼ活性を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含むことからなる組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換せしめた宿主、該セラミドキナーゼの製造方法および該タンパク質の用途に関する。

[背景技術]

スフィンゴ脂質は従来、グリセロリン脂質およびコレステロールとならぶ細胞膜の主要な構成成分の一つと考えられてきた。グリセロリン脂質は細胞膜構造の維持だけでなく、その代謝産物として多くの生理活性物質を産生させることが知られてきたが、スフィンゴ脂質についてはその代謝産物の生理活性については最近までほとんど知られていなかった。近年、いくつかのスフィンゴ脂質の代謝産物にアポトーシスの誘導や細胞増殖刺激作用などの生理活性が知られるようになり、スフィンゴ脂質の代謝酵素が生理的反応や種々の病態に密接に関連する可能性が示唆されるようになった。なかでも、セラミドは多くの細胞機能を調節するレギュレーターとして注目を集めている (Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (1995) TIBS 20, 73-77参照)。

例えば、セラミドはTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインのセカンドメッセンジャーとして機能し、ホスホリパーゼA₂等のアラキドン酸経路を活性化することが知られている (Spiegel, S. et al. (1996) Curr. Opin. Cell Biol. 8, 159-167およびMathias, S. et al. (1993) Science 259, 519-522参照)。すなわち、セラミドを各種炎症性疾患の増悪因子として捕らえることができる。また、HIVに感染した患者におけるCD4 $^+$ T細胞のアポトーシスを伴う減少や脳細胞への感染の際にもセラミドが増悪因子として機能している

という報告がある (Coline, M. G. et al. (1997) Proc. Assoc. Am. Physicians 109, 146-153およびWilt, S. et al. (1995) Ann. Neurol. 37, 381-394参照)。さらには、2型糖尿病や肥満においてTNF- α がインシクリン抵抗性を引き起こすが知られているが、セラミドはその下流においても増悪因子として機能していると考えられている (Begum, N. et al. (1996) Eur. J. Biochem. 238, 214-220およびHotamisligil, G. S. et al. (1996) Science 271, 665-668参照)。また、リポポリサッカライド (LPS) 等が引き金になり起こる敗血症においてもセラミドがセカンドメッセンジャーとして機能していると報告されている (Beutler, B. and Kruys, V. (1995) J. Cardiovasc. Pharmacol. 25, S1-S8 参照)。さらには、動脈硬化層形成の引き金となるLDLの凝集反応においてもスフィンゴミエリナーゼの活性化に伴うセラミドの上昇が増悪因子として機能するという報告がある (Schissel, S. L. et al. (1996) J. Clin. Invest. 98, 1455-1464参照)。

またこれらとは逆に、癌治療における放射線療法や化学療法において、癌細胞のアポトーシスをセラミドが促進することが知られている (Michael, J. M. et al. (1997) Cancer Res. 57, 3600-3605およびBose, R. et al. (1995) Cell 82, 405-414およびJaffrezou, J. P. et al. (1996) EMBO J. 15, 2417-2424参照)。

一方、セラミドの代謝産物であるセラミドー1-リン酸およびその生成酵素であるセラミドキナーゼに関するいくつかの生理活性が知られている。例えば、脳のシナップスにおいて、カルシウム刺激に応答してセラミドキナーゼが活性化され、生成したセラミドー1-リン酸がシナップスからの神経伝達物質の放出を調節している (Bajjalieh, S. M. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14354-14360およびShinghal, R. et al. (1993) J. Neurochem. 61, 2279-2285参照)。したがって、薬剤等によりセラミドキナーゼの活性を調節することは、アルツハイマー病を含めた各種神経性疾患の治療法となる可能性がある。また、セラミドー1-リン酸は上述した各種セラミドの機能をブロックする作用があると考えられている (Dressler, K. A. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 14917-14921参

照)。すなわち、慢性関節炎等の各種炎症性疾患、HIV、インシュリン抵抗性が引き金となる2型糖尿病や肥満、さらには敗血症、動脈硬化といったセラミドが増悪因子として作用する疾患をセラミドー1-リン酸により抑制できると考えられる。したがって、薬剤等によりセラミドキナーゼを活性化することは、各種炎症性疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症や動脈硬化等の治療法となり得る。逆に、癌の放射線療法や化学療法においては、セラミドキナーゼ活性を抑制することにより、セラミド量を保ち、治療効果を向上させることができると考えられる。

また上記の理由により、セラミドの定量が各種病態の解析に重要と考えられている。セラミドキナーゼを用いることにより、細胞または組織内のセラミド含量を特異的に簡便かつ高感度で定量する方法が提供できるものと考えられる。セラミド定量法には、マススペクトル、HPLCなど多くの方法が知られているが、感度または簡便性に問題がある。ジアシルグリセロールキナーゼを用いた方法 (Van Veldhoven, P. P. et al. (1995) Biochem. Mol. Biol. Int. 36, 21-30 参照) も知られているが、該酵素は本来ジアシルグリセロールをリン酸化する酵素であり、特異性および比活性の面で満足できるものとは言い難い。よって、セラミドキナーゼを用いることにより、特異的かつ高感度なセラミドの検出または定量法が確立できるものと考えられる。

しかしながら、セラミドー1-リン酸の生成酵素であるセラミドキナーゼに関しては精製、クローニングの報告がなく、詳細に関しては不明な点も多く残されている。そこで上記各種疾患の治療または予防剤の探索手段としてより好ましく利用できるよう、セラミドキナーゼ遺伝子をクローニングし、そのコードするタンパク質を発現させることが望まれていた。

なお、既知のマウススフィンゴシンキナーゼの配列に基づいて、NCBI (National Center for Biotechnology Information, 米国) のd b E S Tデータベースに対して相同性検索を行うと、本発明のタンパク質をコードするDNAの一部

分に相当するExpressed Sequence Tag (以下「EST」という) 配列が開示されているが、該ESTデータには、本発明のタンパク質の機能に関する具体的な示唆は開示されていない。

すなわち、本発明の目的は、ヒトに存在する新規セラミドキナーゼをコードする遺伝子をクローニングすることによって、神経性疾患治療薬、抗炎症剤、HIV治療薬、抗2型糖尿病薬、抗肥満薬、抗敗血症薬、抗動脈硬化薬および制癌剤の候補物質を探索するための新規な手段や各種病態の解析手段を提供することにある。そのような新しいタイプの薬剤の候補物質探索は、本発明のタンパク質のセラミドキナーゼ活性を活性化または阻害する物質をスクリーニングすることにより行われ、各種病態の解析は本発明のタンパク質を用いて各種標品中セラミドを標識することにより行われ得る。

[発明の開示]

本発明者らは、マウススフィンゴシンキナーゼと部分的にホモロジーを有する新規タンパク質をコードするcDNAをクローニングし、この新規タンパク質の全一次構造を解明することに成功した。さらにこの新規タンパク質を発現させ、この新規タンパク質がセラミドキナーゼ活性を有することを確認することに成功し、本発明を完成させた。

本発明は第一に、下記のi) 乃至 i-ii) のいずれか一つに記載のタンパク質：

i) 配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質；

i-ii) 分子中に配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537に示されるアミノ酸配列の一つもしくは二つ以上のアミノ酸が付加、欠失および／または置換されているアミノ酸配列を含み、セラミドキナーゼ活性を有することを特徴とするタンパク質；

i-iii) 形質転換大腸菌E. coli pCR3.1-CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) が保持するプラスミドに挿入されてい

るDNAにコードされるタンパク質、
に関する。

第二に、本発明は、上記タンパク質をコードするDNAに関する。そのような本発明のDNAとしては、分子中に配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124から1734に示されるヌクレオチド配列を含むDNA；配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124から1734に示されるヌクレオチド配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、セラミドキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とするDNA；または形質転換大腸菌E. coli pCR3.1-CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) が保持するプラスミドに挿入されているDNAが好適であるが、本発明は、これらに限定されず、上記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有するDNAをすべて含むものである。

第三に、本発明は、上記DNAを含む組換えDNAベクターに関する。そのような本発明のベクターとして好適なものは、形質転換大腸菌E. coli pCR3.1-CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) に保持されている組換えDNAベクター pCR3.1-CERK1；または発現ベクターである組換えDNAベクターであるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

第四に、本発明は、上記組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞に関する。そのような本発明の宿主細胞として好適なものは、形質転換大腸菌E. coli pCR3.1-CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184)；または発現ベクターである本発明の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞であるが、本発明はこれらに限定されない。

第五に、本発明は、上記タンパク質の製造方法に関する。その一つの例は、遺伝子工学的手法によるものであり、上記発現ベクターで形質転換された宿主細胞

をセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質の產生が可能な条件下で培養し、次いで、該培養物よりセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質を回収することを特徴とする。

本発明のタンパク質の製造方法のもう一つの例は、生化学的手法によるものであり、下記の (i) 乃至 (i i i) の工程を含む：

(i) カルモジュリンを含まない溶媒に溶解させた (1) 乃至 (3) のいずれか一つに記載のタンパク質を含む材料の抽出物を、置換基としてカルモジュリンを有するアフィニティークロマトグラフィー樹脂に吸着させる；

(i i) (i) の樹脂をカルモジュリンを含まない溶媒で洗浄する；

(i i i) (i i) で洗浄された樹脂から、エチレングリコールビス(β-アミノエチルエーテル) - N, N, N', N' - 四酢酸 (EGTA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む溶媒でセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質を溶出させる。

第六に、本発明は、上記タンパク質、該タンパク質が特異的にリン酸化する基質および任意の化合物または組成物試料を共存させ、次いで、該タンパク質によりリン酸化された基質の量を測定し、その結果を該化合物または組成物を添加しなかつた場合のリン酸化基質の量と比較することを特徴とする、化合物または組成物試料のセラミドキナーゼ活性化または阻害効果を試験する方法に関する。

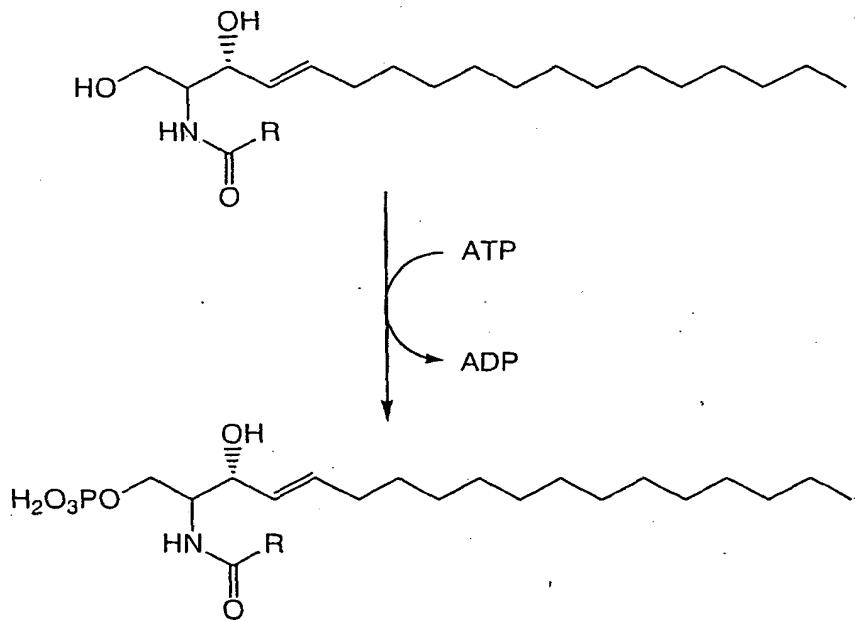
第七に、本発明は、上記タンパク質、被検試料および標識されたアデノシン 5' - 三リン酸 (以下「ATP」という) とを共存させ、次いで、標識されたセラミドを検出または定量することを特徴とする、被検試料中のセラミドを検出または定量する方法に関する。

第八に、本発明は、新規タンパク質である上記タンパク質と特異的に結合する抗体に関する。

すなわち、本発明は、セラミドキナーゼ活性を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、該タンパク質の製造方法、該タンパク質の用途および該タンパク質と特異的に結合する抗体を提供するものである。

本発明において「セラミドキナーゼ活性」とは、D-エリスロースフィンゴシン・N-アセチル体（以下「C₂セラミド」という）、D-エリスロースフィンゴシン・N-ヘキサノイル体（以下「C₆セラミド」という）、D-エリスロースフィンゴシン・N-オクタノイル体（以下「C₈セラミド」という）、D-エリスロースフィンゴシン・N-パルミトイル体（以下「C₁₆セラミド」という）およびウシ胎児脳由来セラミド等の各種セラミドおよびそれらの各種光学異性体の1位の水酸基をリン酸化し、セラミド-1-リン酸を生成せしめる活性、すなわち、下記式：

【化1】



（式中、RはCH₃（C₂セラミドの場合）、C₆H₁₃（C₆セラミドの場合）、C₇H₁₅（C₈セラミドの場合）、C₁₆H₃₃（C₁₆セラミドの場合）、C₁₇H₃₅（C₁₈セラミドの場合）等を表す）

で表される反応を触媒する活性をいう。また本発明のタンパク質が有するセラミ

ドキナーゼ活性によりリン酸化される基質として好適なものは、C₂セラミド、C₆セラミド、C₈セラミド、C₁₆セラミド、ウシ胎児脳由来セラミド（主としてC₁₈セラミドが含有される）等の各種セラミドおよびその各種光学異性体であり、より好適にはC₆セラミドであるが、これらに限定されない。

本発明のタンパク質をコードするDNAは、例えば、本タンパク質を発現する培養細胞などからmRNAを調製した後、これを鋳型としてcDNAを合成し、その中から本発明のタンパク質をコードするcDNAを公知の方法によりスクリーニングするなど、本発明の技術分野において周知の方法により得ることができる。

具体的には例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAは、マウススフィンゴシンキナーゼのcDNAの全配列または部分配列に基づいてプローブを作成し、哺乳動物由来のcDNAライブラリーからストリンジエンシーの弱い条件でのコロニーハイブリダイゼーション法を行って得られるクローンの配列を解析して、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124-1734に示されるヌクレオチド配列との間に高い相同意を示す配列を有するクローンを選択することにより、その一部または全部を取得することができる。また同様に、既知のマウススフィンゴシンキナーゼの配列に基づいてプライマーを作成し（より好適には系統発生的に保存された領域の配列に基づいてプライマーを作成し）、哺乳動物由来のcDNAライブラリーを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という。Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491参照）を行うか、哺乳動物由来のmRNAを鋳型にリバーストランスクリプターゼ-ポリメラーゼ連鎖反応（以下「RT-PCR」という）を行って、その産物の配列を解析し、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124-1734に示されるヌクレオチド配列との間に高い相同意を示す配列を有するクローンを選択することにより、本発明のタンパク質をコードするDNAの一部を得ることができる。

さらに、本発明のタンパク質をコードするcDNAの全長は、例えば、上記の

ようにして得られた部分配列に基づいてプローブを作成し、哺乳動物由来の cDNA ライブラーに対するストリンジメントな条件でのコロニーハイブリダイゼーション法により得られたクローンの配列を解析するか、または、該部分配列に基づいてプライマーを作成し、哺乳動物由来の cDNA ライブラーを鑄型にした PCR または哺乳動物由来の mRNA を鑄型にした RT-PCR を行ってその産物の配列を解析し、必要によりさらに Rapid Amplification of cDNA Ends [以下「RACE」という。実験医学, (1994), 12(6), 35-38 参照。部分配列に基づくプライマーと哺乳動物由来の mRNA を用いるか、または市販のキットと cDNA ライブラーを用いる] を行うことにより得られる。

この mRNA の供給源となる動物細胞は、ヒト胚子腎臓細胞 HEK 293 (ATCC CRL-1573) が好ましいが、各種の哺乳動物由来の細胞または組織、あるいは他の培養細胞株（ヒト由来のものを含む）を使用することもできる。

mRNA の抽出にあたっては、チオシアノ酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアノ酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアノ酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法も採用しうるが、市販の mRNA 分離キットを用いることもできる。

真核細胞の細胞質に存在する mRNA の多くは、その 3' 末端にポリ (A) 配列を持つことが知られているので、この特徴を利用してビオチン化したオリゴ (dT) プローブに mRNA を吸着させ、さらにストレプトアビシンを固定化した常磁性粒子に、ビオチン/ストレプトアビシン間の結合を利用して mRNA を捕捉し洗浄操作の後、mRNA を溶出することにより精製することができる。また、オリゴ (dT) セルロースカラムに mRNA を吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。さらにショ糖密度勾配遠心法などにより、mRNA をさらに分画することもできる。

上記のごとくして得られた mRNA がセラミドキナーゼ活性を有するタンパク

質をコードするものであることを確認するためには、mRNAをタンパク質に翻訳させ酵素活性を調べるか、該タンパク質に特異的な抗体を用いてそのタンパク質を同定する等の方法を用いることができる。例えば、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞にmRNAを注入して翻訳させることができ (Gardon, J. B. et al. (1972) *Nature* 233, 177-182)、あるいは、ウサギ網状赤血球系やコムギ胚芽系といった無細胞翻訳系を利用できる (Schleif, R. F. and Wensink, P. C. (1981): "Practical Methods in Molecular Biology", Springer-Verlag, NY.)。

また、上記方法で得たmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、この一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成することができる。その方法としては、S1ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al. (1976) *Cell* 7, 279-288)、Land法 (Land, H. et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo法 (Yoo, O. J. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1049-1053) なども採用し得るが、本発明の目的には Okayama-Berg法 (Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170) が好適である。

次に、得られたcDNA断片をラムダファージベクターに挿入し自己複製させることによりcDNA断片を持つ組換えファージを安定に保持し、増幅させることができる。例えば、ラムダファージλZAPII (ストラタジーン社製) を用いる場合、宿主大腸菌XL1-Blue MRF'株やJM109株にplaquesを作らせ、それらのplaquesの5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) 代謝による発色の有無から組換え体を選別することができる。なお、ベクターとしては、ラムダ系のファージベクター以外に、プラスミドベクターも用いることができる。

また、市販の各種cDNAライブラリー (例えば、クローンテック社製) を用

いることもできる。

上記のようにして得られるライブラリーから、目的のセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする cDNA を有するクローンを選別する方法としては、例えば以下に示す各種方法のいずれかを採用できる。

(1) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法： 目的のタンパク質のアミノ酸配列の全部、または一部が解明されている場合（該配列は、複数個連続した特異的配列であれば、目的のタンパク質のどの部分でもよい）、該アミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し（コドンの縮重のあるアミノ酸に対しては、使用頻度の高いコドンを用いても、または考えられるコドンを組み合わせて複数個のヌクレオチド配列を合成してもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これを³²P、³⁵S またはビオチン等で標識したものをプローブとして、組換えファージDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターまたはナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性クローンを検索して、これを選択する。

(2) ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法： 目的のタンパク質のアミノ酸配列の全部または一部が解明されている場合、該アミノ酸配列のN末端側の一部に対応するセンス鎖と、同じくC末端側の一部に対応するアンチセンス鎖のオリゴヌクレオチドを合成し、PCRを行い、目的のタンパク質をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる錆型DNAとしては、本発明のタンパク質を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を、³²P、³⁵S またはビオチン等で標識し、これをプローブとして用いたブラークハイブリダイゼーションまたはコロニーハイブリダイゼーションによるcDNAライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを実施して、目的のクローンを選択する。

(3) 他の動物細胞株でセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質を産生させてスクリーニングする方法： 前記のようにして得た cDNA を発現ベクターに挿入したプラスミド（自己複製可能で、転写プロモーター領域を含むプラスミド、もしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれも使用できる）で動物細胞宿主を形質転換し、それら cDNA にコードされたタンパク質を産生させ、その培養上清または細胞抽出物中の、セラミドキナーゼ活性を測定するか、または、本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体、および該抗体に対する二次抗体を用いて、本発明のタンパク質の存在を検出することにより、本発明のタンパク質をコードする cDNA を有する株を選択する。なお、動物細胞宿主としては COS や CHO 等の汎用される細胞株を使用できるが、外来遺伝子産物としての本発明のタンパク質の検出を容易にするため、宿主自体は一定の培養条件下で本発明のタンパク質を産生しない細胞であることが好ましい。

(4) セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法： 形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルターまたはナイロンフィルターなどにプロットし、本発明のタンパク質の産生能を有する組織または細胞から抽出した mRNA をハイブリダイズさせた後、 cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収した mRNA を、タンパク質翻訳系（例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや、コムギ胚芽などの無細胞系）でタンパク質に翻訳させ、そのタンパク質のセラミドキナーゼ活性を調べるか、またはセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質に対する抗体を用いて検出し、目的の株を選択する。

上記のようにして得られた目的の形質転換株からの本発明のタンパク質をコードする DNA の採取は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従い実施できる。例えば、細胞よりプラスミド DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より cDNA 領域を切り出すことにより行い得る。

また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の取得に際しては、PCR法によるDNA/RNA增幅法も好適に利用できる。殊にライブラリーから全長のcDNAが得られないような場合には、前記RACEによって全長cDNAの両端まで取得することができる。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定することができ、常法に従い合成することができる。

このようにして得られる本発明のDNAのヌクレオチド配列の決定は、例えば、マキサム—ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) : "Methods in Enzymology" 65, 499-559) やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276) などにより行うことができる。また、ラジオアイソトープの代わりに蛍光色素を用いた自動DNA配列解析装置 (例えば、パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ社製モデル373A等) を使用することもできる。

なお、本発明のタンパク質として最も好適なものをコードするcDNAが挿入されたプラスミドを保持する形質転換大腸菌株E. coli pCR3.1-CER K1 SANK 70300は、2000年6月2日付けで日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号の産業技術総合研究所・特許生物寄託センターに国際寄託され、受託番号FERM BP-7184が付されている。したがって、本発明のタンパク質をコードする遺伝子は、該菌株から取得することが可能である。

上記のようにしてクローン化された、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を含む断片をベクターDNAに組み込むことにより、他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらにこれらのベクターに適当なプロモーター、および形質発現に関わる配列を導入することにより、それぞれの宿主において遺伝子を発現させることができる。

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌 (Escherichia coli) や枯草菌 (Bacillus subtilis) などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内

で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

例えば、大腸菌としてはK 1 2 株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般にp B R 3 2 2 やp U C系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されず、公知の各種菌株、およびベクターがいずれも使用できる。

プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン（trp）プロモーター、ラクトース（lac）プロモーター、トリプトファン・ラクトース（tac）プロモーター、リポプロテイン（lpp）プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子Tu（tufB）プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも本発明のタンパク質の產生に使用することができる。

枯草菌としては、例えば2 0 7 - 2 5 株が好ましく、ベクターとしてはp T U B 2 2 8 (Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93) などが用いられるが、これに限定されるものではない。

プロモーターとしては、枯草菌の α -アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるC O S 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182、ATCC CRL-1650) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220) 等がよく用いられているが、これらに限定されない。

脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864) 等が挙げられるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、およびRNAスプライス部位を具えたものを用いることができる。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル (DEAE) 一デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457)、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845) などによりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) やpSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341)などをコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、本発明のタンパク質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、鱗翅類ヤガ科のSpodoptera frugiperdaの卵巣細胞由来株化細胞 (Sf-9 またはSf-21) や Trichoplusia niの卵細胞由来High Five細胞 (Wickham, T. J. et al. (1992) Biotechnol. Prog. 1: 391-396) などが宿主細胞としてよく用いられ、バキュロウイルストラスファーベクターとしてはオートグラファ核多角体ウイルス (AcNPV) のポリヘドリンタンパク質のプロモーターを利用したpVL1392

／1393がよく用いられる (Kidd, I. M. and V. C. Emery (1993) The use of baculoviruses as expression vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology 42, 137-159)。この他にも、バキュロウイルスのP10や同塩基性タンパク質のプロモーターを利用したベクターも使用できる。さらに、AcNPVのエンベロープ表面タンパク質GP67の分泌シグナル配列を目的タンパク質のN末端側に繋げることにより、組換えタンパク質を分泌タンパク質として発現させることも可能である (Zhe-mei Wang, et al. (1998) Biol. Chem., 379, 167-174)。

真核微生物を宿主細胞とした発現系としては、酵母が一般によく知られており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばパン酵母*Saccharomyces cerevisiae*や石油酵母*Pichia pastoris*が好ましい。該酵母などの真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター (Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025) や酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター (Miyanohara, A. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5)などを好ましく利用できる。また、分泌型タンパク質として発現させる場合には、分泌シグナル配列と宿主細胞の持つ内在性プロテアーゼあるいは既知のプロテアーゼの切断部位をN末端側に持つ組換え体として発現することも可能である。例えば、トリプシン型セリンプロテアーゼのヒトマスト細胞トリプターゼを石油酵母で発現させた系では、N末端側に酵母のαファクターの分泌シグナル配列と石油酵母の持つKEX2プロテアーゼの切断部位をつなぎ発現させることにより、活性型トリプターゼが培地中に分泌されることが知られている (Andrew, L. Niles, et al. (1998) Biotechnol. Appl. Biochem. 28, 125-131)。

上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、または細胞外に本発明のタンパク質が産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記COS細胞であれば、RPMI1640培地やダルベ

シコ改変イーグル培地（以下「DMEM」という）などの培地に、必要に応じウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

このようにして発現させた本発明のタンパク質は、その物理化学的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作（「生化学データブック I I」、1175-1259項、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, vol. 25, No. 25, p8274-8277 (1986)；Eur. J. Biochem., 163, p313-321 (1987)等参照）により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白質沈殿剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、凍結融解法、超音波破碎、限外ろ過、ゲルfiltration、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、それらの組み合わせ等を例示できる。

特に、本発明のタンパク質のアミノ酸配列中にはカルモジュリン結合配列として知られている配列モチーフ「1-8-14モチーフ タイプB (Rhoads, A. R. and Friedberg, F, The FASEB Journal 11, 331-340参照)」に相当する配列（配列表の配列番号2の422-435に示されるアミノ酸配列）が存在するので、本発明のタンパク質を含む標品を、置換基としてカルモジュリンを有するアフィニティーコロマトグラフィー樹脂（例えば、カルモジュリン・セファロース）に吸着させ、次いでこの樹脂をカルモジュリンを含まない溶媒で洗浄した後、EGTAまたはEDTAを含む溶媒で本発明のタンパク質を溶出させる方法により、本発明のタンパク質を効率よく精製・回収することが可能である。

また、発現させる組換えタンパク質に6残基からなるヒスチジンタグを繋げることにより、ニッケルアフィニティーカラムで効率的に精製することができる。

上記方法を組み合わせることにより容易に高収率、高純度で本発明のタンパク質を大量に製造できる。

なお、上記のようにして精製された本発明のタンパク質のアミノ酸配列は、自動タンパク質アミノ酸配列決定装置（例えば、パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ社製モデル492）を用いて確認することができる。

このようにして本発明のDNAから遺伝子工学的手法により得られるタンパク質がセラミドキナーゼ活性を発現するためには、必ずしも配列表の配列番号2のアミノ酸番号1-537に示されるアミノ酸配列と完全に一致する配列からなるものである必要はなく、例えばその部分配列であっても、それがセラミドキナーゼ活性を示す限り、そのような部分配列からなるものもまた本発明のタンパク質に包含される。また、該タンパク質をコードするDNAも本発明に含まれる。

一般に真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子などで知られているように、多型現象（polymorphism）を示すと考えられ（例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem. 97, 153-159を参照）、この多型現象によって、一個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の置換はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。配列表の配列番号2のアミノ酸番号-1から537に示されるアミノ酸配列からなる本発明のタンパク質アミノ酸配列中の、一つもしくは二つ以上の部位において、一つもしくは二つ以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入および／または置換されているタンパク質でも、セラミドキナーゼ活性を有することが多い〔天然型のアミノ酸配列が置換したアミノ酸配列を有するタンパク質が、天然型タンパク質と同等の活性を有する例として、例えば、インターロイキン2 (IL-2) 遺伝子のシステインに相当するヌクレオチド配列をセリンに相当するヌクレオチド配列に変換して得られたタンパク質が、IL-2活性を保持することが知られている。 (Wang, A. et al. (1984) Science 224, 1431-1433) 〕。これらのタンパク質は、セラミドキナーゼ活性を有する限り、全て本発明に含まれる。また、これらのタンパク質をコードする、同効のヌクレオチド配列からなるDNAも全て本発明に含まれる。

このような各種の本発明のDNAは、上記セラミドキナーゼ活性を有するタン

パク質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al. (1984) *Nature* 310, 105-111) などの常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。

なお、所望のアミノ酸に対応するコドンは、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる。 (Grantham, R. et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 143-174)。さらに、これらヌクレオチド配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した、部位特異的変異導入法 (site specific mutagenesis/Mark, D. F. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5662-5666) などに従うことができる。また、任意の一つもしくは二つ以上のアミノ酸残基を欠失させた改変体を作製するためには、エキソヌクレアーゼ B a l 3 1 等を用いてDNAを末端から削る方法 (岸本 利光ら “続生化学実験講座 1・遺伝子研究法 I I ” 335-354)、カセット変異法 (岸本 利光、 “新生化学実験講座 2・核酸 I I I 組換えDNA技術 ” 242-251) などに従うことができる。

上記のようなセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質のうち、好適なものとしては、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 のメチオニン残基をN末端とする 5 3 7 個のアミノ酸からなるタンパク質を例示できる。

また、あるDNAが配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 2 4 から 1 7 3 4 に示されるヌクレオチド配列からなるDNAとハイブリダイズするか否かは、例えば目的とするDNAをランダムプライマー法 (Anal. Biochem., 132: 6013 (1983)) やニックトランスレーション法 (Maniatis, T. et al. (1982) in “Molecular Cloning A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory, NY.) 等に従い、 $[\alpha - ^{32}P]$ d CTP 等で標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い調べることができる。ハイブリダイゼーションに用いるDNAは、公知の方法、例えばニトロセルロース膜やナイロン膜等に吸着させ、加

熱あるいは紫外線照射により固相化させる。次いで、その膜を例えば $6 \times$ SSC、5% デンhardt (Denhardt) 溶液および0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (以下「SDS」という) を含むプレハイブリダイゼーション溶液に浸し、5 5°Cで4時間以上保温する。その後、先に作成した標識プローブを同様のプレハイブリダイゼーション溶液に最終比活性 1×10^6 c p m/m lとなるように加え、60°Cで一晩保温する。膜を57°Cで5分間洗浄する操作を5回繰り返し、さらに57°Cで20分間洗浄後、オートラジオグラフィーを行うことにより、ハイブリダイズしたか否かを判定することができる。この方法を利用して、各種動物細胞由来のcDNAライブラリーから、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124から1734に示されるヌクレオチド配列からなるDNAとハイブリダイズするcDNAを単離することができる。(Maniatis, T. et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)。

上記のような本発明のタンパク質をコードするDNAとして好適なものとしては、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1から4463で示されるヌクレオチド配列からなるDNAを例示でき、より好適には配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124から1734で示されるヌクレオチド配列からなるDNAを例示できる。

本発明のタンパク質がセラミドキナーゼ活性を有することは、例えば基質に放射性の 32 P-ATPを用いるスフィンゴシンキナーゼ活性測定用のシュピーゲルらの方法 (Olivera, A. and Spiegel, S. (1993) Nature 365, 557-560参照) を改変した以下の方法に従って確認することができる。

具体的には、当該タンパク質を含む溶液と、塩化マグネシウム、EDTA、ジチオスレイトル、バナジン酸ナトリウム、プロテアーゼインヒビター (例えば、コンプリート (商標名。ベーリンガーマンハイム社製)) を含むヘペス緩衝液 (pH 7.0)、基質 [ウシ血清アルブミン (以下「BSA」という) 溶液 (4 mg/m

1) に溶解した C₆セラミド、もしくはオクチルグルコシドを用いてミセル化したセラミド (ウシ胎児脳よりの精製品 (シグマ社製))]、さらには放射標識³²P-A TPを混合し、37℃で保温することによりセラミドキナーゼ反応を行う。次に、1N塩酸を加えることにより反応を停止させ、クロロホルム：メタノール：濃塩酸 (100:200:1, v/v) を加えて抽出操作を施し、得られた下層 (クロロホルム層) を薄層クロマトグラフィー (以下「TLC」という) で展開、分析する。セラミドキナーゼ活性は上記TLCにおいて、生成物であるセラミドー1-リン酸 (以下「Cer-1-P」という) のスポットを定量することにより得られる。

ただし、本発明のタンパク質のセラミドキナーゼ活性検出方法はこれらの方法に限定されず、本発明のタンパク質が限定的にリン酸化し得る他の基質 (例えば³Hや¹⁴C放射標識セラミドや各種蛍光標識セラミド等) を使用することも可能である。

また、上記のセラミドキナーゼ活性検出方法において、合成された化合物や微生物培養物からの抽出物等の被検試料を基質リン酸化反応時に共存させ、該被検試料が本発明のタンパク質のセラミドキナーゼ活性を活性化または阻害するか否かを調べることにより、セラミドキナーゼ活性化剤または阻害剤の評価乃至スクリーニングが可能である。例えば、ある化合物を基質リン酸化反応時に共存させたときのリン酸化基質の量 (「a」とする) を、該化合物を添加しなかった場合のリン酸化基質の量 (「b」とする) と比較し、aがbよりも大きくなる場合は、該化合物はセラミドキナーゼの活性化作用があると判定でき、逆に、aがbよりも小さくなる場合は、該化合物はセラミドキナーゼの阻害作用があると判定できる。特に、本発明のタンパク質のセラミドキナーゼ活性を特異的に活性化する作用が強く、他のリン酸化酵素 (キナーゼ) の活性に影響しないような物質については、セラミドキナーゼ特異的活性化剤として前述の各種病態 (各種炎症性疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、動脈硬化等) における薬効が期待できる。一方、本発明のタンパク質のセラミドキナーゼ活性を特異的に阻害する作用が強く、他のリン酸化酵素 (キナーゼ) の活性に影響しないような物質については、セラミドキナーゼ特異的阻害

剤として前述の用途（癌の放射線療法や化学療法における治療効果の向上等）における薬効が期待できる。

また、本発明のタンパク質と特異的に結合する抗体の例として、本発明のタンパク質と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。すなわち、

- (a) 抗原として使用する生体高分子の精製、
- (b) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- (c) 骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- (d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- (e) 目的とする抗体を產生するハイブリドーマ群の選別、
- (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- (g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、またはハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- (h) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、およびその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、

等である。

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞およびミエローマを使用することもできる。

(a) 抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製した本発明のタンパク質またはその一部を使用することができる。さらに、本発明により該タンパク質の一次構造が

明らかにされたので、例えば、当業者に周知の方法を用いて該タンパク質の部分ペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することもできる。

(b) 抗体産生細胞の調製

工程 (a) で得られた抗原と、フロイントの完全または不完全アジュバント、またはカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、マウスが最も好適に用いられるが、これに限定されない。

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射いずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。

免疫は、一回、または、適当な間隔で（好ましくは1週間から5週間間隔で）複数回繰返し行なうことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給原として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を後の細胞融合に用いることが好ましい。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下「RIA法」という）、固相酵素免疫定量法（以下「ELISA法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、および操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法またはELISA法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行なうことができる。まず、精製または部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばBSAにより覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中のモノクローナル抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素

の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

(c) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) ミエローマ株P3X63Ag8U.1 (P3-U1) [Yelton, D. E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)] 、P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1) [Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)] 、Sp2/0-Ag14 (SP-2) [Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978)] 、P3X63Ag8.653 (653) [Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)] 、P3X63Ag8(X63) [Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)] などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、およびウシ胎児血清 (以下「FCS」という) を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地] 、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; 以下「IMDM」という) 、またはDMEMで継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地 [例えば、10% FCSを含むASF104培地 (味の素(株)社製)] で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

(d) 細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、およびその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾、リンパ節、末梢血、またはこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。この脾細胞と工程(c)で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われて

いるのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単なポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えばRPMI 1640）、またはリン酸緩衝生理食塩液（以下「PBS」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が5:1～10:1程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈殿した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら1mLの50%（w/v）ポリエチレングリコール（分子量1000～4000）を含む無血清培地を滴下する。その後、10mLの無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈殿した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン（以下「HAT」という）液およびマウスインターロイキン-2（以下「IL-2」という）を含む正常培地（以下「HAT培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下「プレート」という）の各ウェルに分注し、5%炭酸ガス存在下、37°Cで2週間程度培養する。途中適宜HAT培地を補う。

（e）ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、およびミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。したがって、HAT含有培地中の培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。

コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT培地からアミノブテリンを除いた培地（以下「HT培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ELISA法により抗体価を測定する。

以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

(f) クローニング

工程 (b) の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を產生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニュピレーターによって1個づつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便でありよく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体產生ハイブリドーマ株として選択する。

(g) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナーパー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えば、上記のBALB/c）、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、MAb Trap GIIキット；ファルマシア社製）等を利用することもできる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質に対して高い抗原特異性を有する。

(h) モノクローナル抗体の検定

得られたモノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー(Ouchterlony)法、ELISA法、またはRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法またはRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット(例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製)等を利用することもできる。

さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、および280nmにおける吸光度より算出する方法 [$1.4 (OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1 \text{ mg/mL}$]により行うことができる。

このようにして得られる本発明のモノクローナル抗体は、その特異性を利用した本発明のタンパク質の検出や分離精製に用いることができる。

本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、該タンパク質の有するセラミドキナーゼ活性が治療または予防に有効であるような疾患(各種炎症性疾患、HIV感染、2型糖尿病、肥満、敗血症、動脈硬化等)の遺伝子治療に用いることができる。遺伝子治療においては、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス(無毒化されたもの)を患者に感染させる。患者体内では本発明のタンパク質が産生され、セラミドキナーゼ活性を表すので、前述の疾患において症状を改善したり進行を抑制することができる。

遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、実験医学増刊、12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」、羊土社（1996））のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに、TR4あるいは変異TR4をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ（*in vivo*）法およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスピボ（*ex vivo*）法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1), 23-48 (1994)、実験医学増刊、12 (15)(1994)）。

例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルスリポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができます。

配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列の部分配列に相補的なヌクレ

オチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常15乃至30merからなるDNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはモルフォリノ誘導体などの安定なDNA誘導体、2'-O-アルキルRNAなどの安定なRNA誘導体として用いられ得る。そのようなアンチセンス分子を、微量注入、リポソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124-1734に示されるヌクレオチド配列がコードするタンパク質の活性を減少させることにより、例えば、癌の放射線療法や化学療法における治療効果の向上が期待できる。

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、レミントンのPharmaceutical Sciencesに記載されている。そして、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号124-1734に示されるヌクレオチド配列を含む遺伝子の発現やその遺伝子産物の活性に異常の認められる動脈硬化の治療に十分な量を各人に投与される。その有効量は、各人の状態、体重、性別、及び年齢などの種々の因子や、皮下、局所、経口、及び筋肉内といった投与方法の違いによって変化し得る。例えば、静脈注射する場合には、0.02乃至0.2mg/kg/時間で2時間、また、皮下投与の場合には、1乃至200mg/m²/日のように変化し得る。

[発明を実施するための最良の形態]

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」[Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

[実施例1] cDNAクローニング

1) マウススフィンゴシンキナーゼ1と弱い相同性をもつcDNAクローンの検索とスクレオチド配列の解析

既知のマウススフィンゴシンキナーゼ1のアミノ酸配列に基づいて、NCBIのd b E S Tデータベースに対してtblastnのアルゴリズムを用いて相同性検索を行い、マウススフィンゴシンキナーゼ1のに相同性のあるE S Tクローン (GenBank accession number AA355581) を見出した。

このE S Tクローンのスクレオチド配列をコードするcDNAのクローンを得るため、以下に記載する方法により、P C Rにより作製したプローブを用いてライプラリースクリーニングを行った。

2) P C RによるcDNA断片の増幅

E S TクローンAA355581に基づく以下の2つのオリゴスクレオチドプライマー：

5' - tcaccactgacatcatcgttactgaacatgcta -3' (cerk1 : 配列表の配列番号3) ; および

5' - caacgatatgcagcgccgaggttctgcgtcgctg -3' (cerkal : 配列表の配列番号4) を合成した。

次いで、市販cDNAライプラリーを鋳型として、LA P C Rキット・バージョン2.1 (宝酒造(株)社製) を用いたP C Rを行なった。すなわち、5 μlのcDNAライプラリー (Marathon-Ready human leukemia (クロンテック社製)) とオリゴスクレオチドプライマー (cerk1およびcerkal) 各0.4 μM、ならびにd A T P、d G T P、d C T P、d T T P各400 μM、2.5 mM 塩化マグネシウムを含む1×LA P C R緩衝液、0.05単位のLA T a q DNAポリメラーゼ (以上キットに添付) からなる50 μlの反応液を調製した。この反応液を94℃で2分間加熱した後、94℃で1分、60℃で1分、72℃で2分の温度サイクルを30サイクル繰り返してから、72℃で10分間保温した (タカラP C Rサ

ーマルサイクラー MP (宝酒造(株)社製)を使用)。この反応液を1%アガロースゲル電気泳動で解析した結果、目的とする300bpに近い大きさのDNA断片のバンドが観察された。このバンドを含むゲル片を切りだし、該ゲル片からこのバンドのDNA断片を、抽出用キット (QIAクイックゲルエクストラクションキット。キアゲン社製)を用いて回収した。得られたDNA断片を、T/Aクローニング法 (Clark, J. M. et al. (1988) Nucleic Acid Res. 16:9677-9686)によりpCR 2.1ベクター(真核生物用TAクローニングキット(インビトロゲン社製)に添付)に連結し、大腸菌TOP10F'株(真核生物用TAクローニングキットに添付)に導入した。得られた形質転換株よりプラスミドDNA pCR 2.1-CE R KMを抽出し、挿入されているcDNAの全ヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド鎖終結法によりヌクレオチド配列を決定した。その結果、得られたヌクレオチド配列は、上記1)のESTクローンAA355581のヌクレオチド配列の一部(配列番号1のヌクレオチド番号611~910)をコードするものであった。

3) プラークハイブリダイゼーション用フィルターの調製

市販のcDNAライブラリー (Lambda ZAP IIライブラリー(ストラタジーン社製))を用いてライブラリースクリーニングを行った。

まずLambda ZAP IIライブラリーの力価を以下に記載する方法により決定した。大腸菌XL-1 Blue MR F'株を10mM 硫酸マグネシウムおよび0.2% マルトースを含むLB培地(10gの塩化ナトリウム、10gのバクトリptonおよび5gの酵母エキスを水1リットルに溶解、pH 7.0に調整した培地)中、37°Cで培養した。対数増殖期に、遠心して大腸菌体を回収し、600nmの吸光度(OD₆₀₀)が0.5となるように10mM 硫酸マグネシウム溶液を加えて懸濁した。ファージ液をTE緩衝液で10⁴~10⁷倍になるよう希釈し、各希釈液1μlを200μlの大腸菌懸濁液と混合し、37°Cで15分間保温した後、48°Cに保温した軟寒天培地 [LB培地(10gの塩化ナトリウム、10gのバクトリptonおよび5gの酵母エキスを水1リットルに溶解、pH 7.0に調整し

た培地) に 0. 7 % のアガーレを加えたもの] を加え、滅菌済プラスチックシャーレに播種した。このものを 37°C で 6 乃至 8 時間培養後、plaques を計数することにより、力値を算出した結果、得られたプライマリーライブライバーの力値は 4.6×10^6 plaque forming units (以下「p.f.u.」という) であった。

プライマリーライブライバーは一般に不安定であるので、 1×10^6 p.f.u.相当のプライマリーライブライバーを上述と同様の方法で再度大腸菌に感染させて増幅したものを回収し、Lambda ZAP II ライブライバーを得た。

Lambda ZAP II ライブライバーのうち、 5×10^5 plaque相当のDNAをニトロセルロースフィルター（ストラタジーン社製）に固定した。すなわち、cDNA ライブライバーを有するファージの感染した大腸菌を直径 15 cm のプレートあたり 5×10^4 個のplaquesが形成されるように分散させた。ニトロセルロースフィルターはプレートに乗せて、18Gの注射針で 3カ所穴を空けることにより、後で位置を固定するための印を付けた。室温で 2 分間放置してファージplaquesを移しとった後、フィルターを剥がし、アルカリ溶液 (0.5N 水酸化ナトリウムおよび 1.5M 塩化ナトリウム) 中に 2 分間、次いで中和溶液 (1.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸 (pH 8.0)) 中に 5 分間、さらに洗浄液 (2×SSC) を含む 0.2M トリス-塩酸 (pH 7.5) 中に 30 秒間浸した後、室温で 2 時間風乾させた。風乾後のフィルターはさらに 80°C にて 2 時間加温して plaques を固相化させた。

4) プローブの作製およびハイブリダイゼーション

上記 2) で得られたプラスミド pCR 2.1 - CERKM を制限酵素 EcoRI で消化して得られた挿入DNA断片 (300 bp) をDNAラベリングキット (ランダムプライマーラベリングシステム、ギブコ BRL 社製) を使用して ^{32}P 標識した (Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132, 6)。次にゲル濾過用樹脂を充填したマイクロスピニカラム (プローブ・クアント G-50 マイクロカラム、ファルマシア社製) を用いて、取り込まれなかつたヌクレオチドを

除去した。

一方、上記3)で調製したブラーク転写済ニトロセルロースフィルターを、50%ホルムアミド、5×SSC、5×デンhardt (Denhardt) 溶液、0.1% SDS および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子DNAを含む溶液中で、37°C、2時間インキュベーションを行なった (プレハイブリダイゼーション) 後、 ^{32}P 標識したプローブを $1 \times 10^6 \text{ cpm}/\text{フィルター}$ となるよう添加し、37°Cで12乃至18時間インキュベーションした (ハイブリダイゼーション)。その後、フィルターを1×SSC、0.1% SDSを含む溶液中で37°Cで20分間、さらに0.1×SSC、0.1% SDSを含む溶液中で60°Cで1時間洗浄してから、オートラジオグラフィーを行なった。

その結果、1次スクリーニングで12個の陽性ブラークが同定された。これらのブラークをプレートから採取し、そのそれぞれについて上述のスクリーニング操作を繰り返すことにより、最終的に7個の陽性クローンを得た。個々の陽性クローンについてLambda ZAP II Library (ストラタジーン社製) に添付されたヘルパーファージ (ExAssist) と共に大腸菌SOLR株に共感染させることにより、目的のcDNAを含むpBlue script ファージミドベクターへの切り出しを行った。以上の操作により、pBlue script ファージミドベクターに目的のcDNAが挿入されたプラスミドを保持する形質転換大腸菌株を得た。これらファージミドDNAについて制限酵素EcoRIによる消化を行って、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施し、目的のcDNAの長さを調べた。その結果、挿入cDNAの長さがそれぞれ約1.5 kbp、約3.5 kbp および約4.4 kbp である3種類のプラスミド (pBK-29、pBK-5 および pBK-33) が得られた。

5) ヌクレオチド配列の決定

上記4)で得られたプラスミドpBK-29、pBK-5 および pBK-33に挿入されているcDNAの全ヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド鎖終結法により決定した。なお、一部の配列は全自动DNA配列解析装置 (モデル373A、

(株) パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ社製) を使用して解析した。その結果、pBK-33に挿入されているcDNAは、pBK-29およびpBK-5の挿入cDNAの全配列を含む4463bpからなるヌクレオチド配列(配列表の配列番号1)を有していた。さらに、このヌクレオチド配列および該ヌクレオチド配列に含まれるオープンリーディングフレーム(以下「ORF」という)にコードされているアミノ酸配列(配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537)について、GenBankおよびEMBLのDNAデータベースならびにSWISS-PROTプロテインデータベースに対して相同性検索を行った結果、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537に示されるアミノ酸配列には特に高い相同性を有する機能既知のタンパク質はなく、新規タンパク質であることが判明した。また、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537に示されるアミノ酸配列とヒトスフィンゴシンキナーゼ1または2との全長にわたるアミノ酸配列相同性は29%しかないものの、スフィンゴシンキナーゼに種を越えて系統的に保存されたドメイン部分(T. Kohama et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 23722-23728参照)については相同性が高かった。さらに、モチーフ検索を行ったところ、PHドメイン(A. D. Ma & C. S. Abrams (1999) Thromb. Haemost. 82, 399-406参照)とジアシルグリセロールキナーゼドメイン(F. Sakana & H. Kanoh (1997) Int. J. Biochem. Cell Biol. 29, 1139-1143参照)を有することが示唆された。このようにして得られた新規タンパク質をコードするcDNAをhCERK1と命名した。

[実施例2] 組換え体の発現

1) 発現ベクターの作製

脊椎動物細胞発現系を利用して、実施例1で得られたhCERK1を発現させ、発現タンパク質を得た。まず、サイトメガロウイルスのプロモーターの下流に、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1から537に示すアミノ酸配列をコードするcDNA領域を有し、該cDNAを発現させるための真核生物発現ベクターを構築した。

上記ベクター作製のために、実施例1の4)で得られたpBK-33を制限酵素SaciIで消化し、挿入cDNAを含む約2.3kbの断片を単離した。一方、

真核生物発現用ベクター p C R 3. 1 (インビトロゲン社製) を制限酵素 E c o R I で消化しアルカリフォスファターゼで脱リン酸化した。上記 2. 3 k b p 断片および p C R 3. 1 ベクターについて、DNA ブランディングキット (宝酒造 (株) 社製) を用いて平滑末端化処理を行った後、T 4 DNA リガーゼ (宝酒造 (株) 社製) を用いた反応により両者を連結し、大腸菌 T O P 1 0 F' 株に導入した。得られた形質転換株よりプラスミド DNA p C R 3. 1 - C E R K 1 を抽出し、挿入されている c DNA の全ヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド鎖終結法により確認した。

なお、この発現用プラスミド p C R 3. 1 - C E R K 1 を保持する形質転換大腸菌株 E. c o l i p C R 3. 1 - C E R K 1 S A N K 7 0 3 0 0 は、2000年6月2日付で日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号の産業技術総合研究所・特許生物寄託センターに国際寄託され、受託番号 F E R M B P - 7 1 8 4 が付された。

2) 動物細胞での発現

本発明のタンパク質がセラミドキナーゼ活性を有するか否かを確認するため、上記で得られた発現ベクター p C R 3. 1 - C E R K 1 を、ヒト胚子腎臓細胞 H E K 2 9 3 (ATCC C R L - 1 5 7 3) にトランスフェクションした。すなわち、組織培養用ポリリジンコート 6 ウェルプレート (岩城硝子 (株) 社製) に 1 ウェルあたり 6×10^5 個の H E K 2 9 3 細胞を入れて、37°Cで 24 時間培養した後に、1 μ g の p C R 3. 1 - C E R K 1 をトランスフェクション試薬 (リポフェクタミン・プラス、ライフテクノロジー社製) を添付のプロトコールにしたがって用いることによりトランスフェクションした。トランスフェクション操作終了後の細胞を37°Cで 1 日間培養した後、培地を除去してから、緩衝液 A (10% グリセロール、1 mM ジチオスレイトール、1 mM E D T A、1 mM バナジン酸ナトリウム、プロテアーゼインヒビター (コンプリートTM、ベーリングマンハイム社製)、200 mM ヘペス緩衝液、p H 7. 0) にて細胞を回収した。回収した細胞を、プローブ型ソニケーター (セル・ディスラプター 2 0 0、プランソン社製) にて超音波破碎し、この細胞破碎液を希釈して実施例 3 に示す酵素活性測定に用いた。

また、pCR3.1発現ベクターは、抗生物質G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を有するので、pCR3.1-CERK1をトランスフェクションした後のHEK293細胞をG418存在下で培養することにより、G418耐性のニロニーを選択した。このようにして、本発明のタンパク質を安定に产生する形質転換細胞を得た。

[実施例3] セラミドキナーゼ活性の測定

セラミドキナーゼ活性の測定は、上記実施例2で調製した本発明のタンパク質を含む細胞破碎液を用い、[³²P]-γ-ATPおよび各種セラミドを基質として用い、以下に記載する方法に従って行った。

具体的には、実施例2で調製した本発明のタンパク質を含む180μlの緩衝液B [1mM ジチオスレイトール、1mM EDTA、1mM バナジン酸ナトリウム、プロテアーゼインヒビター (コンプリートTM、ベーリンガーマンハイム社製)、1mM 塩化カルシウム、200mM ヘペス緩衝液、pH 7.0] に、BSA溶液 (4mg/ml) を用いて調整した1mM C₆セラミド 10μlおよび100mM 塩化マグネシウムと2mMの放射標識 [³²P]-γ-ATP (NEN社製)との混合液 10μlを添加し、37°Cで20分間保温することによりセラミドキナーゼ反応を行った。次に、1N塩酸 20μlを加えることにより反応を停止させ、クロロホルム：メタノール：濃塩酸 (100:200:1, v/v) 800μl、2.5M 塩化カリウム 250μlおよびクロロホルム 250μlを加えて抽出操作を施し、抽出液を2000×gで遠心分離した後、得られた下層 (クロロホルム層) をTLCで展開、分析した。なお、TLCに用いる展開溶媒としては、ブタノール-エタノール-水-酢酸 (80:20:10:20) が好適であった。セラミドキナーゼ活性は上記TLCにおいて、生成物であるセラミド-1-リン酸 (以下「Cer-1-P」という) に相当するスポット (空のベクターpCR3.1で形質転換した細胞由来の試料を用いた陰性対照反応液の抽出液と比較して、pCR3.1-CERK1で形質転換した細胞由来の試料を用いた反応の抽出物で強く表れるスポットとして同定される) の放射活性をイメージングアナライ

ザー (B A S 2 0 0 0 、富士フィルム) で定量することにより得た。

上記方法で測定した結果、実施例 2 で得られた本発明のタンパク質を含む酵素液のセラミドキナーゼ活性は、基質が C₆セラミドの場合は 1 2 8 0 p m o l / m i n / m g であった。C₆セラミドに対する K_m 値は 7 μM であった。なお、陰性反応対照として p C R 3. 1 ベクターのみを H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクションした際の細胞破碎液を酵素液として同様に測定した際のセラミドキナーゼ活性は 7 p m o l / m i n / m g であった。

また、ウシ胎児脳由来のセラミドなど天然型のセラミドを基質とするときにはオクチルグルコシドなどの界面活性剤を用いてセラミドをミセル化した方がより好適であった。すなわち、クロロホルムに溶解した必要量のセラミドを窒素気流下で乾固し、0. 2 % オクチルグルコシドをふくむ緩衝液 B を加えて超音波処理し、1 0 0 μM セラミド溶液をつくった。その基質溶液 1 0 0 μl に酵素液を含む緩衝液 B 9 0 μl、1 0 0 mM 塩化マグネシウムおよび 2 mM 放射標識 [³²P] - γ - A T P の混合液 1 0 μl を添加し、37 °C で 2 0 分間保温することによりセラミドキナーゼ反応を行った。C e r - 1 - P の抽出操作は上記と同様に行った。この方法で測定した本発明のタンパク質を含む酵素液のセラミドキナーゼ活性は、基質がウシ胎児脳由来セラミドの場合は 2 0 0 p m o l / m i n / m g であった。

次に C₆セラミドを基質に用いて本発明のタンパク質の至適アッセイ条件の検討を行った。その結果、本発明のタンパク質の至適 p H は 7 - 7. 5 であり、塩化マグネシウム、塩化カルシウムによって活性化された。また、トライトン X - 1 0 0 やコール酸などの界面活性剤やホスファチジルセリン、トリス緩衝液により本セラミドキナーゼ活性は阻害された。また、本発明のタンパク質を発現させた細胞破碎液より、3 0 0 0 × g で未破碎細胞を除いた後、1 0 0 0 0 0 × g で膜画分と細胞質可溶性画分に分けて、それぞれの画分のセラミドキナーゼ活性を測定したところ、膜画分により強力なセラミドキナーゼ活性が認められた。

セラミドキナーゼ活性は、今までに神経シナプス小胞 (S. M. Bajjalieh, et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14354-14360参照)、H L - 60 細胞 (K. A. Dressler, et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 14917-14921参照)、好中球 (V. T. Hinkovska-Galcheva, et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 33203-33209参照) 等で報告されており、それらの共通の性質として、カルシウムで活性化されること、膜結合型であること、至適 pH が中性であることが挙げられているが、本発明のタンパク質組換え体のセラミドキナーゼ活性はこれらの全ての性質を有していた。

また、本発明のタンパク質はジアシルグリセロール（以下「DG」という）キナーゼドメイン (F. Sakana & H. Kanoh (1997) Int. J. Biochem. Cell Biol. 29, 1139-1143参照) を有するものの、DG キナーゼには影響しないカルシウムによって活性化されること、DG キナーゼの活性化因子であるホスファチジルセリン (H. Kanoh et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1767-1774参照) により阻害されることなど、DG キナーゼとは明らかに異なる性質を有していた。

次に、本発明のタンパク質の基質特異性を調べるために、上記のように pCR3.1 - CERK1 を HEK293 細胞に発現させた場合と、pCR3.1 ベクターのみを HEK293 細胞に発現させた場合 (HEK293 細胞の内在性の酵素活性) とで、各種脂質を基質とした際のリン酸化活性を比較した (表 1)。

【表 1】

基質	リン酸化活性 (pmol/min/mg)		活性比 (pCR3.1-CERK1/ pCR3.1)
	で形質転換	で形質転換	
C 6 セラミド	1280	7	183
ウシ胎児脳由来セラミド	200	10	20
D G	150	130	1
D-エリスロースフィンゴシン	50	50	1

本発明のタンパク質はC₆セラミド、天然型ウシ胎児脳由来セラミド等の各種セラミドを高効率にリン酸化した。一方、上記セラミドキナーゼの至適アッセイ条件下ではD Gやスフィンゴシン等の脂質はほとんどリン酸化せず、セラミドに対する高い基質特異性を示した。

[産業上の利用の可能性]

以上述べたごとく、本発明により、セラミドキナーゼ活性を有する新規タンパク質および該タンパク質をコードするDNAが提供された。さらに本発明は、該タンパク質を使用したセラミドキナーゼ活性化剤または阻害剤の試験方法および該タンパク質を使用した特異的かつ高感度なセラミド定量方法を提供した。本発明のタンパク質またはそれをコードするDNAは、セラミドキナーゼに対して特異的な活性化または阻害活性を有し、神経性疾患治療薬、抗炎症剤、HIVの治療薬、抗2型糖尿病薬、抗肥満薬、抗敗血症薬、抗動脈硬化薬および制癌剤として有用な新規化合物の探索や、上記各種病態の解析に有用である。

請求の範囲

1. 下記の i) または i i) の特徴を有するタンパク質：
 - i) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 5 3 7 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質；
 - i i) 分子中に配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 5 3 7 に示されるアミノ酸配列の一つもしくは二つ以上のアミノ酸が付加、欠失および／または置換されているアミノ酸配列を含み、セラミドキナーゼ活性を有することを特徴とするタンパク質。
2. 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 5 3 7 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
3. 形質転換大腸菌 E. coli pCR3. 1 - CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) が保持するプラスミドに挿入されている DNA にコードされるタンパク質。
4. 請求の範囲第 1 項乃至第 3 項のいずれか一つに記載のタンパク質をコードする DNA。
5. 分子中に配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 2 4 から 1 7 3 4 に示されるヌクレオチド配列を含む DNA。
6. 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 2 4 から 1 7 3 4 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、セラミドキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする DNA。
7. 形質転換大腸菌 E. coli pCR3. 1 - CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) が保持するプラスミドに挿入されている DNA。
8. 請求の範囲第 4 項乃至第 7 項のいずれか一つに記載の DNA を含む組換え DNA ベクター。
9. 形質転換大腸菌 E. coli pCR3. 1 - CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) に保持されていることを特徴とする、請求の範囲第 8 項記載の組換え DNA ベクター。

10. 発現ベクターであることを特徴とする、請求の範囲第9項記載の組換えDNAベクター。

11. 請求の範囲第8項乃至第10項のいずれか一つに記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

12. 形質転換大腸菌E. coli pCR3.1-CERK1 SANK 70300 (FERM BP-7184) であることを特徴とする、請求の範囲第11項記載の宿主細胞。

13. 請求の範囲第10項記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

14. 請求の範囲第13項記載の宿主細胞を、セラミドキナーゼ活性を有するタンパク質の産生が可能な条件下で培養し、次いで、該培養物よりセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質を回収することを特徴とする、セラミドキナーゼ活性を有するタンパク質の製造方法。

15. 下記の(i)乃至(iii)の工程を含む、請求の範囲第1項乃至第5項のいずれか一つに記載のタンパク質の製造方法：

(i) カルモジュリンを含まない溶媒に溶解させた請求項1乃至3のいずれか一つに記載のタンパク質を含む材料の抽出物を、置換基としてカルモジュリンを有するアフィニティークロマトグラフィー樹脂に吸着させる；

(ii) (i)の樹脂をカルモジュリンを含まない溶媒で洗浄する；

(iii) (ii)で洗浄された樹脂から、EGTAまたはEDTAを含む溶媒でセラミドキナーゼ活性を有するタンパク質を溶出させる。

16. 下記の工程を含む、化合物または組成物試料のセラミドキナーゼ活性化または阻害効果を試験する方法：

(i) 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか一つに記載のタンパク質、該タンパク質が特異的にリン酸化する基質および該化合物または組成物試料を共存させた混合物を調製し、一方、該化合物または組成物試料を添加せず、該タンパク質および該基質を共存させた混合物を調製する；

(ii) 上記(i)で調製された各混合物における、リン酸化された基質の量を測定し比較する。

17. 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか一つに記載のタンパク質が特異的にリン酸化する基質が、C₂セラミド、C₆セラミド、C₈セラミド、C₁₆セラミドおよびウシ胎児脳由来セラミドからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求の範囲第16項記載の方法。

18. 被検試料中のセラミドを検出または定量する方法であって、請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか一つに記載のタンパク質、被検試料および標識されたアデノシン5'－三リン酸とを共存させ、次いで、標識されたセラミドを検出または定量することを特徴とする方法。

19. セラミド検出または定量用キットの製造のための、請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか一つに記載のタンパク質の使用。

20. 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか一つに記載のタンパク質と特異的に結合する抗体。

21. 請求の範囲第4項乃至第7項のいずれか一つに記載のDNAを有効成分として含むことを特徴とする医薬組成物。

22. 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列中の連続した15乃至30ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなる核酸。

23. 請求の範囲第22項に記載の核酸を有効成分として含むことを特徴とする医薬組成物。

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> Ceramide Kinase and DNA Thereof

<130> FP-200117

<140>

<141>

<150> JP 2000-178039

<151> 2000-06-14

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4463

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (124)..(1734)

<400> 1

gcgcgcgcctc ccgcagcccg ccgcggcccg cccggccccc gggccactgc agggccgcgt 60

aacgggtccgg cgccgcgtcg cgtccgcgcg ccccccagcct ggcggacgag cccggcggcg 120

gag atg ggg gcg acg ggg gcg gag ccg ctg caa tcc gtg ctg tgg 168

Met Gly Ala Thr Gly Ala Ala Glu Pro Leu Gln Ser Val Leu Trp

1

5

10

15

gtg aag cag cag cgc tgc gcc gtg agc ctg gag ccc gcg cgg gct ctg 216

Val Lys Gln Gln Arg Cys Ala Val Ser Leu Glu Pro Ala Arg Ala Leu

20

25

30

ctg cgc tgg tgg cgg agc ccg ggg ccc gga gcc ggc gcc ccc ggc gcg 264

Leu Arg Trp Trp Arg Ser Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ala Pro Gly Ala

35

40

45

gat gcc tgc tct gtg cct gta tct gag atc atc gcc gtt gag gaa aca 312

Asp Ala Cys Ser Val Pro Val Ser Glu Ile Ile Ala Val Glu Glu Thr

50

55

60

gac gtt cac ggg aaa cat caa ggc agt gga aaa tgg cag aaa atg gaa 360

Asp Val His Gly Lys His Gln Gly Ser Gly Lys Trp Gln Lys Met Glu

65

70

75

aag cct tac gct ttt aca gtt cac tgt gta aag aga gca cga cgg cac 408

Lys Pro Tyr Ala Phe Thr Val His Cys Val Lys Arg Ala Arg Arg His

80

85

90

95

3/14

cgc tgg aag tgg gcg cag gtg act ttc tgg tgt cca gag gag cag ctg 456
Arg Trp Lys Trp Ala Gln Val Thr Phe Trp Cys Pro Glu Glu Gln Leu

100 105 110

tgt cac ttg tgg ctg cag acc ctg cgg gag atg ctg gag aag ctg acg 504
Cys His Leu Trp Leu Gln Thr Leu Arg Glu Met Leu Glu Lys Leu Thr
115 120 125

tcc aga cca aag cat tta ctg gta ttt atc aac ccg ttt gga gga aaa 552
Ser Arg Pro Lys His Leu Leu Val Phe Ile Asn Pro Phe Gly Gly Lys
130 135 140

gga caa ggc aag cgg ata tat gaa aga aaa gtg gca cca ctg ttc acc 600
Gly Gln Gly Lys Arg Ile Tyr Glu Arg Lys Val Ala Pro Leu Phe Thr
145 150 155

tta gcc tcc atc acc act gac atc atc gtt act gaa cat gct aat cag 648
Leu Ala Ser Ile Thr Thr Asp Ile Ile Val Thr Glu His Ala Asn Gln
160 165 170 175

gcc aag gag act ctg tat gag att aac ata gac aaa tac gac ggc atc 696
Ala Lys Glu Thr Leu Tyr Glu Ile Asn Ile Asp Lys Tyr Asp Gly Ile
180 185 190

gtc tgt gtc ggc gga gat ggt atg ttc agc gag gtg ctg cac ggt ctg 744
Val Cys Val Gly Gly Asp Gly Met Phe Ser Glu Val Leu His Gly Leu
195 200 205

att ggg agg acg cag agg agc gcc ggg gtc gac cag aac cac ccc cgg 792

Ile Gly Arg Thr Gln Arg Ser Ala Gly Val Asp Gln Asn His Pro Arg

210

215

220

gct gtg ctg gtc ccc agt agc ctc cgg att gga atc att ccc gca ggt 840

Ala Val Leu Val Pro Ser Ser Leu Arg Ile Gly Ile Ile Pro Ala Gly

225

230

235

cca acg gac tgc gtg tgt tac tcc acc gtg ggc acc agc gac gca gaa 888

Pro Thr Asp Cys Val Cys Tyr Ser Thr Val Gly Thr Ser Asp Ala Glu

240

245

250

255

acc tcg gcg ctg cat atc gtt gtt ggg gac tcg ctg gcc atg gat gtg 936

Thr Ser Ala Leu His Ile Val Val Gly Asp Ser Leu Ala Met Asp Val

260

265

270

tcc tca gtc cac cac aac aac aca ctc ctt cgc tac tcc gtg tcc ctg 984

Ser Ser Val His His Asn Ser Thr Leu Leu Arg Tyr Ser Val Ser Leu

275

280

285

ctg ggc tac ggc ttc tac ggg gac atc atc aag gac agt gag aag aaa 1032

Leu Gly Tyr Gly Phe Tyr Gly Asp Ile Ile Lys Asp Ser Glu Lys Lys

290

295

300

cgg tgg ttg ggt ctt gcc aga tac gac ttt tca ggt tta aag acc ttc 1080

Arg Trp Leu Gly Leu Ala Arg Tyr Asp Phe Ser Gly Leu Lys Thr Phe

305

310

315

ctc tcc cac cac tgc tat gaa ggg aca gtg tcc ttc ctc cct gca caa 1128

Leu Ser His His Cys Tyr Glu Gly Thr Val Ser Phe Leu Pro Ala Gln

320	325	330	335	
				1176
cac acg gtg gga tct cca agg gat agg aag ccc tgc cgg gca gga tgc				
His Thr Val Gly Ser Pro Arg Asp Arg Lys Pro Cys Arg Ala Gly Cys				
340	345	350		
				1224
ttt gtt tgc agg caa agc aag cag cag ctg gag gag gag cag aag aaa				
Phe Val Cys Arg Gln Ser Lys Gln Gln Leu Glu Glu Glu Gln Lys Lys				
355	360	365		
				1272
gca ctg tat ggt ttg gaa gct gcg gag gac gtc gag gag tgg caa gtc				
Ala Leu Tyr Gly Leu Glu Ala Ala Glu Asp Val Glu Glu Trp Gln Val				
370	375	380		
				1320
gtc tgt ggg aag ttt ctg gcc atc aat gcc aca aac atg tcc tgt gct				
Val Cys Gly Lys Phe Leu Ala Ile Asn Ala Thr Asn Met Ser Cys Ala				
385	390	395		
				1368
tgt cgc cgg agc ccc agg ggc ctc tcc ccg gct gcc cac ttg gga gac				
Cys Arg Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser Pro Ala Ala His Leu Gly Asp				
400	405	410	415	
				1416
ggg tct tct gac ctc atc ctc atc cgg aaa tgc tcc aag ttc aat ttt				
Gly Ser Ser Asp Leu Ile Leu Ile Arg Lys Cys Ser Lys Phe Asn Phe				
420	425	430		
				1464
ctg aga ttt ctc atc agg cac acc aac cag cag gac cag ttt gac ttc				
Leu Arg Phe Leu Ile Arg His Thr Asn Gln Gln Asp Gln Phe Asp Phe				
435	440	445		

act ttt gtt gua gtt tat cgc gtc aag aaa ttc cag ttt acg tcg aag 1512

Thr Phe Val Glu Val Tyr Arg Val Lys Lys Phe Gln Phe Thr Ser Lys

450

455

460

cac atg gag gat gag gac agc gac ctc aag gag ggg ggg aag aag cgc 1560

His Met Glu Asp Glu Asp Ser Asp Leu Lys Glu Gly Gly Lys Lys Arg

465

470

475

ttt ggg cac att tgc agc agc cac ccc tcc tgc tgc tgc acc gtc tcc 1608

Phe Gly His Ile Cys Ser Ser His Pro Ser Cys Cys Cys Thr Val Ser

480

485

490

495

aac agc tcc tgg aac tgc gat ggg gag gtc ctg cac agc cct gcc atc 1656

Asn Ser Ser Trp Asn Cys Asp Gly Glu Val Leu His Ser Pro Ala Ile

500

505

510

gag gtc aga gtc cac tgc cag ctg gtt cga ctc ttt gca cga gga att 1704

Glu Val Arg Val His Cys Gln Leu Val Arg Leu Phe Ala Arg Gly Ile

515

520

525

gaa gag aat ccg aag cca gac tca cac agc tgagaagccg gcgtcctgct 1754

Glu Glu Asn Pro Lys Pro Asp Ser His Ser

530

535

cacaaaactgg gaaagtgtga aaactatittt agataattat tacagaccaa ttatgttcat 1814

atatacattt aaatgttagaa atttattttt gatagttaaa tcttgattttt agaagaaaaac 1874

ccttttgtca acaattttgt gtacatattt ggcattttca gttctgtacg catctgcggg 1934

ttgcagccca cgccgcttac tctcagcgga tgcagctgct cacttggggg cactggcctc 1994

ttaggtttta acgatgtcaa cagtgttagtt tagaaaatgg cccgttagtg gctctattgc 2054

aataatgtta gggacattat atgatttcca cgcaggtcac accatctggg cctgaggtag 2114

cagtgggtca ctttgatcca ctttgcagga cttattctgt aacggttgt ggccaagttt 2174

tgggaagtgg ttgattatct ttgccttcat ttcacccccc tcttcgttta cggttaggac 2234

atcgctgctt gatccttaca atactgtgca actgcaatgc aacgtggccc tgttcaggt 2294

gatccgcggg aggggcctcc acgccagcgc cgggaaggct gctggggcct ccacacctgc 2354

ctcatcacgg cggcgaggct acgacaatcc ggctgggagc atgacccctgg cgtctgttct 2414

gggagcacag atgataagct ctggaagctg gcagtgtgta aagcactggc aagtttgttta 2474

ctgttaaaat gtcaaatacc aatgctttat atcgacgcga agtgcctaac acagccggc 2534

ttgggggcag tcaggaggaa gctggccatc cgtggaggag gggccggtcc tggactcccg 2594

caggactcct ctgatgcagg gcctgaagtc tgtacacgtg gtccaaattt gtccttgtct 2654

tttcttcaca ctgagttctc tatatttattt gaacatcttgc tccctttaag ccagagtagt 2714

gtaaaactgcg tctcgatgt ctgtcttttgc tgtcgaagcc acgatggatc gctggttcc 2774

tctgcagcgc aagggctccg gcgaccagag gattttccc ggaaaggcat tcctgccg 2834

ctccccgggg caccctcaa ttgtgtacta cgtcctgtt tagtgttat ccgtccccac 2894

gttagatgatg tctgtaacgt agttttgtt gaaatatgag aatatgcggc ttaaactttg 2954

atctgtaagg agcggggccg tggccgttg gagcacgctg tagacaccgt tcctcatgct 3014

gccgggtggg ttttgcagaa gctcccttag tgatttcatg tttaacaggc agcatccatt 3074

ttcagaattt cctggcattt atttatattt tgaagcatac agaaaacttc tcgtttcctc 3134

gttttagcccc acccagatca ggtgaaaggg cagcttaat ggtggtttt atggaccaca 3194

ttatcagaga gcactgtgca agccaaatgg ttcaataatg aatgaaaatt ctgggtgtaa 3254

agagtaaata tgccctggct ctttctacca atgtttgctc ctgggtggaa agaaaccaaa 3314

gatttaagac gggctgctct tccagactgg ctgtgcctgc ctgtgccag caacctntgc 3374

agccggcagt gtgcctggtg tcacgccagg aggctgtggc tgctgtggc cctctggaaat 3434

tgtgctcctc acaaagtttc cccaaaaggt tcttctaagc ctttatttgc cctggtaaat 3494

gtttccggc tggcgcggg ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg aggccgaggc 3554

gggtggatca cctaaggtca ggagttgag atcagcctgc ccaacatggt gaaacctcgt 3614

ctctactaaa aatacacaac ttagccagtc ttgttggcgc acgcctgtaa tctcagctac 3674

tagggatgct gaggcaggag aatcgcttga acccaagaaa gaggtggagg ttgcggtag 3734

ccaagattgc gccactgcac tccagcctgg gcaacagagg gagactccat cgccccccct 3794

caacaacaaa aaaagttcc catacactgg cctgccccaa aacccactaa caattttagc 3854

aaaacagtcc agccaaagag gaagcatttc atgttcaata agaaacccag ccattccgca 3914

tggctggttc ctgagtggtct cttggatatac tctccagcca cctgctgaca ttcaaatct 3974

cagacctcgg ggactgctgt tgcggtaaccg tgtgtctgac acctgccagc agccctttgc 4034

tatctgcgcg caggatgggg gtgactgccc agacattccc gctagatagg ctctgatttc 4094

cggggcagcc tttcagatgc ggcagacata caacacctgt acttagatgt tttagggaa 4154

aaaaaaaaatca gaagtgcgtgg ttagatagta aaaacttagg ataacttaga aaggctagtt 4214

ttagcttcct ttgtggctcc ctggtgcaaa acaatttagca gttatgcaat ggacctgatt 4274

ctagtttatt ctaattaaga agtggggccg ggtttgactt cgttcctgaa tacaatctt 4334

agtaactggg aaagtctgag tgaaaggatg gcctcattct ctttctaattc ttgctggttt 4394

caagattaga aaatggcatt atttgatctg aaatgtttga gaagacacga ataaagctcg 4454

tgccgaatt 4463

10/14

<210> 2

<211> 537

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Ala Thr Gly Ala Ala Glu Pro Leu Gln Ser Val Leu Trp Val

1

5

10

15

Lys Gln Gln Arg Cys Ala Val Ser Leu Glu Pro Ala Arg Ala Leu Leu

20

25

30

Arg Trp Trp Arg Ser Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ala Pro Gly Ala Asp

35

40

45

Ala Cys Ser Val Pro Val Ser Glu Ile Ile Ala Val Glu Glu Thr Asp

50

55

60

Val His Gly Lys His Gln Gly Ser Gly Lys Trp Gln Lys Met Glu Lys

65

70

75

80

Pro Tyr Ala Phe Thr Val His Cys Val Lys Arg Ala Arg Arg His Arg

85

90

95

Trp Lys Trp Ala Gln Val Thr Phe Trp Cys Pro Glu Glu Gln Leu Cys

100

105

110

His Leu Trp Leu Gln Thr Leu Arg Glu Met Leu Glu Lys Leu Thr Ser

115

120

125

Arg Pro Lys His Leu Leu Val Phe Ile Asn Pro Phe Gly Gly Lys Gly

130

135

140

Gln Gly Lys Arg Ile Tyr Glu Arg Lys Val Ala Pro Leu Phe Thr Leu

145

150

155

160

Ala Ser Ile Thr Thr Asp Ile Ile Val Thr Glu His Ala Asn Gln Ala

165

170

175

Lys Glu Thr Leu Tyr Glu Ile Asn Ile Asp Lys Tyr Asp Gly Ile Val

180

185

190

Cys Val Gly Gly Asp Gly Met Phe Ser Glu Val Leu His Gly Leu Ile

195

200

205

Gly Arg Thr Gln Arg Ser Ala Gly Val Asp Gln Asn His Pro Arg Ala

210

215

220

Val Leu Val Pro Ser Ser Leu Arg Ile Gly Ile Ile Pro Ala Gly Pro

225

230

235

240

Thr Asp Cys Val Cys Tyr Ser Thr Val Gly Thr Ser Asp Ala Glu Thr

245

250

255

Ser Ala Leu His Ile Val Val Gly Asp Ser Leu Ala Met Asp Val Ser

260

265

270

12/14

Ser Val His His Asn Ser Thr Leu Leu Arg Tyr Ser Val Ser Leu Leu

275

280

285

Gly Tyr Gly Phe Tyr Gly Asp Ile Ile Lys Asp Ser Glu Lys Lys Arg

290

295

300

Trp Leu Gly Leu Ala Arg Tyr Asp Phe Ser Gly Leu Lys Thr Phe Leu

305

310

315

320

Ser His His Cys Tyr Glu Gly Thr Val Ser Phe Leu Pro Ala Gln His

325

330

335

Thr Val Gly Ser Pro Arg Asp Arg Lys Pro Cys Arg Ala Gly Cys Phe

340

345

350

Val Cys Arg Gln Ser Lys Gln Gln Leu Glu Glu Glu Gln Lys Lys Ala

355

360

365

Leu Tyr Gly Leu Glu Ala Ala Glu Asp Val Glu Glu Trp Gln Val Val

370

375

380

Cys Gly Lys Phe Leu Ala Ile Asn Ala Thr Asn Met Ser Cys Ala Cys

385

390

395

400

Arg Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser Pro Ala Ala His Leu Gly Asp Gly

405

410

415

Ser Ser Asp Leu Ile Leu Ile Arg Lys Cys Ser Lys Phe Asn Phe Leu

13/14

420

425

430

Arg Phe Leu Ile Arg His Thr Asn Gln Gln Asp Gln Phe Asp Phe Thr

435

440

445

Phe Val Glu Val Tyr Arg Val Lys Lys Phe Gln Phe Thr Ser Lys His

450

455

460

Met Glu Asp Glu Asp Ser Asp Leu Lys Glu Gly Gly Lys Lys Arg Phe

465

470

475

480

Gly His Ile Cys Ser Ser His Pro Ser Cys Cys Cys Thr Val Ser Asn

485

490

495

Ser Ser Trp Asn Cys Asp Gly Glu Val Leu His Ser Pro Ala Ile Glu

500

505

510

Val Arg Val His Cys Gln Leu Val Arg Leu Phe Ala Arg Gly Ile Glu

515

520

525

Glu Asn Pro Lys Pro Asp Ser His Ser

530

535

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a fragment of cDNA encoding human ceramide
kinase

<400> 3

tcaccactga catcatcggtt actgaacatg cta

33

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a fragment of cDNA encoding human ceramide
kinase

<400> 4

caacgatatg cagcgccgag gtttctgcgt cgctg

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/48, C07K16/40, A61K31/7125, A61K48/00, A61P3/04, A61P3/10, A61P7/00, A61P25/00, A61P29/00, A61P31/18, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/48, C07K16/40, A61K31/7125, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
 MEDLINE (STN),
 EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 00/52173, A2 (NPS Allelix Corporation), 08 September, 2000 (08.09.00), Claims; Figs. 7, 9; sequence list, sequence Nos. 7, 9 & AU, 2000-28999, A	1-23
PX	WO, 00/58473, A2 (Curagen Corporation), 05 October, 2000 (05.10.00), Claims; pages 207, 217, 411, 413, 418, 419; sequence list, sequence Nos. 3171, 3172, 4293, 4294 & AU, 2000-37745, A	22-23
A	Gene, Vol. 251[1], (13 June, 2000), A. J. Melendez et al., "Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution", pages 19 to 26	1-23
A	J. Biol. Chem., Vol. 273[37], (1998), T. Kohama et al., "Molecular Cloning and functional Characterization of Murine Sphingosine Kinase", pages 23722 to 23728	1-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
26 June, 2001 (26.06.01)Date of mailing of the international search report
10 July, 2001 (10.07.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephonc No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/48, C07K16/40, A61K31/7125, A61K48/00, A61P3/04, A61P3/10, A61P7/00, A61P25/00, A61P29/00, A61P31/18, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/48, C07K16/40, A61K31/7125, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 00/52173, A2 (NPS Allelix Corp.) 08. 9月. 2000 (08. 09. 00) (特許請求の範囲、第7, 9図、配列表配列番号7, 9参照) &AU, 2000-28999, A	1-23
PX	WO, 00/58473, A2 (Curagen Corp.) 5. 10月. 2000 (05. 10. 00) (特許請求の範囲、第207, 217, 411, 413, 418, 419頁、 配列表配列番号3171, 3172, 4293, 4294参照) &AU, 2000-37745, A	22-23

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 06. 01

国際調査報告の発送日

10.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Gene, Vol. 251[1] (2000-Jun-13) A. J. Melendez et al. "Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution" p. 19-26	1-23
A	J. Biol. Chem., Vol. 273[37] (1998) T. Kohama et al. "Molecular Cloning and functional Characterization of Murine Sphingosine Kinase" p. 23722-23728	1-23

